

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

<p>97-310593/28 B04 C06 D16 AMCY 95.11.30 CYANAMID IBERICA SA *WO 9720036-A1 95.11.30 95ES-002370 (97.06.05) C12N 7/01, A61K 39/225, 39/235, C12N 15/86, A61K 39/295, C07K 14/17</p> <p>Recombinant adenovirus useful in vaccine to protect pigs from infection by the virus - contains S gene sequence from transmissible porcine gastroenteritis virus (S_{Spn}) C97-099965 N(AL AM AT AU AZ BB BG BR BY CA CH CN CZ DE DK EE ES FI GB GE HU IL IS JP KE KG KP KR KZ LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK TJ TM TR TT UA UG US UZ VN) R(AT BE CH DE DK EA ES FI FR GB GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UG)</p> <p>Addnl. Data: PLANA DURAN J, ENJUANES L, TORRES J M, SANCHEZ C M, SMERDOU C, SUNE C 96.10.01 96WO-ES00185</p>	<p>BC(4-F11E, 14-S11A) D(5-H7, 5-H12F) .2</p> <p>protein. <u>MORE SPECIFICALLY</u> The recombinant adenovirus (I) comprises a sequence which encodes ≥ 1 of the four antigenic sites (A,B,C and D) of the S protein. Especially, (I) contains nucleotides -8 to 1135, 1587, 3329 or 4470 of the S gene.</p> <p><u>USE</u> (I) is used for preparing vaccines against TPGV (claimed). The vaccines may be multivalent for protecting pigs against TPGV and other porcine infections, including rotavirus, porcine respiratory and reproductive syndrome virus or <i>Serpulina hydosenteriae</i> (all claimed). Administration of the vaccines is via mucosal routes, specifically orally, nasally or intraperitoneally. Piglets can be protected by passive immunisation via milk of sows injected before or during gestation. Typical dosage is 10⁹ - 10¹⁰ pfu.</p> <p><u>PREPARATION</u> Recombinant adenovirus constructs are prepared by cloning WO 9720036-A+</p>
<p>A recombinant adenovirus (I) which contains in its genome the S gene sequence, or a sequence derived from it, of the transmissible porcine gastroenteritis virus (TPGV) is new.</p> <p>Also claimed is a recombinant TPGV S protein, or part of the</p>	

specific fragments of the TPGV S gene into adenovirus Ad5 in the region of a deleted E3 gene. The specific constructs designated Ad-TS-8, Ad-TS-5, Ad-TS-9 and Ad-TS-06 contain nucleotides -8 to 1135, -8 to 1587, -8 to 3329 and -8 to 4470 of the S gene, respectively. To isolate the relevant fragment, the full-length S gene is cloned into plasmids pBluescript or pYA and digested with restriction enzymes (Hinc II with XhoI (1135); Hinc II with Hind III (3329); Hinc II with Asp I (4470); or Hinc II only, to cut at positions -8 and 1587). Each S gene fragment is cloned into the multicloning site of plasmid pSV2x3 or pSV2x4, i.e. so that it is flanked by the SV40 promoter (Pr) and a poly-adenylation (An) sequence.

Plasmids pFG144K3 and pAB14 both contain the Ad5 genome with a partially deleted E3 region containing a unique XbaI site. The 'SV40 Pr-S gene fragment-An' cassette is excised by XbaI and inserted into the unique XbaI site of the Ad5 Δ E3 plasmid. The resulting constructs are incapable of producing infectious Ad5, except if co-transfected into 293 cells with plasmid pFG173 containing the 5'-half of Ad5.

After co-transfection, the four constructs Ad-TS-8, Ad-TS-5, Ad-TS-9 and Ad-TS-06 are isolated and sequenced to verify correct insertion of fragments. These recombinant adenoviruses produce S protein fragments of 378 (C + B antigenic sites), 529 (C+B+D sites),

1109 (C+B+D+A sites) and 1490 (C+B+D+A sites) amino acids, respectively (see figure).

EXAMPLE

Antisera (3 ml) from pigs immunised with one of the four specified Ad-TS constructs was incubated at 37 °C for 1 hour with 10^7 pfu of a virulent strain of TPGV (i.e. PUR-46-SW11-ST2). Control sera were taken from pigs immunised with constructs lacking the S gene inserts.

After incubation, the mixture was administered intragastrically to 2-day-old pigs which were highly susceptible to TPGV infection and to offspring of sows seronegative for TPGV. Inoculated animals were fed three times a day with artificial milk supplemented with 3 ml of corresponding antiserum.

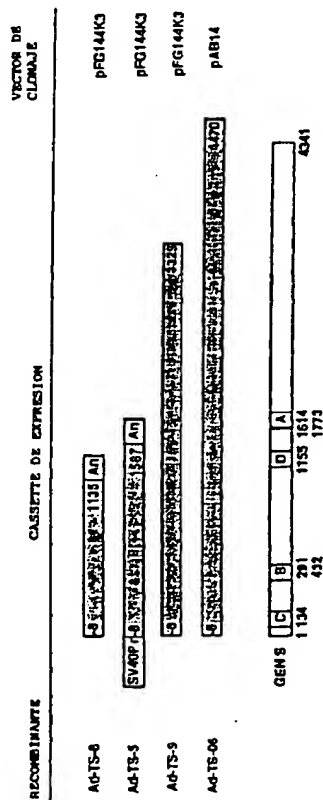
Viral titres in extracts of jejunum-ileum, mesenteric ganglia, lung and mediastinum ganglia were determined on days 1 and 2 post-infection and on the day of death. Any animals which did not die were sacrificed 5 days post-infection.

Results showed that recombinant virus which contained all four antigenic sites (i.e. Ad-TS-9 and Ad-TS-06) gave complete protection against infection by TPGV (i.e. viral titres were $< 10^2$ pfu/g of tissue

WO 9720036-A+1

in all tissues and no animals died within five days of infection.

The other two constructs gave partial protection against TPGV (i.e. viral titres of 10^1 - 10^3 pfu/g for Ad-TS-5 and 10^2 - 10^4 pfu/g for Ad-TS-8). However, onset of enteritis and death was retarded compared to control animals. (TC)



(46pp937DwgNo.3/7)
SR:8.Jnl.Ref WO9118627

OPI DATE 19/06/97 APPLN. ID 71325/96
 AOJP DATE 14/08/97 PCT NUMBER PCT/ES96/00185



SOL

AU9671325

(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C12N 7/01, 15/86, A61K 39/225, 39/235, C07K 14/17, A61K 39/295		A1	(11) Número de publicación internacional: WO 97/20036 (43) Fecha de publicación internacional: 5 de Junio de 1997 (05.06.97)
(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00185 (22) Fecha de la presentación internacional: 1 de Octubre de 1996 (01.10.96) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9502370 30 de Noviembre de 1995 ES (30.11.95) (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CYANAMID IBERICA, S.A. [ES/ES]; Cristobal Bordiu, 35, E-28003 Madrid (ES). (72) Inventores: e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): PLANA DURAN, Juan [ES/ES]; "La Riba", Carretera Camprodón, E-17813 Vall de Bianya (ES). ENJUANES, Luis [ES/ES]; Calle Camino Nuevo, 113, E-28100 Alcobendas (ES). TORRES, Juan María [ES/ES]; Calle Padilla, 17, E-28100 Alcobendas (ES). SANCHEZ, Carlos Miguel [ES/ES]; Calle Villajoyosa, 94 Bajo F, E-28041 Madrid (ES). SMERDOU, Cristian [ES/ES]; Avenida Brasilia, 37, E-28028 Madrid (ES). SUÑE, Carles [ES/ES]; Gran Vía Carlos III, 58-60, E-08028 Barcelona (ES).		(74) Mandatario: GOMEZ-ACEBO Y DUQUE DE ESTRADA, Ignacio; Jorge Juan, 19-3° Derecha, E-28001 Madrid (ES). (81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, Patente ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i> <i>Con una indicación relativa a un microorganismo depositado, presentada de conformidad con lo dispuesto en la Regla 13^{bis}, separadamente, y no con la descripción.</i> <i>Fecha de la recepción en la Oficina Internacional:</i> 18 de octubre de 1997 (18.10.97)	
(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRUSES WHICH EXPRESS ANTIGENS OF THE TRANSMISSIBLE PORCINE GASTROENTERITIS VIRUS AND USE THEREOF IN THE FORMULATION OF VACCINES			
(54) Título: ADENOVIRUS RECOMBINANTES QUE EXPRESAN ANTIGENOS DEL VIRUS DE LA GASTROENTERITIS PORCINA TRANSMISIBLE (VGPI) Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS			
(57) Abstract The recombinant adenoviruses contain in their genomes the sequence of the gene S of the transmissible porcine gastroenteritis virus or a sequence derived from said gene which contains, at least, one of the antigenic sites of the protein S of the transmissible porcine gastroenteritis virus. Said recombinant adenoviruses may be used in the formulation of vaccines in order to protect porcine cattle against the infection by the transmissible porcine gastroenteritis virus and against the disease caused by said virus. This invention applies to the veterinary science.			
(57) Resumen Los adenovirus recombinantes contienen en su genoma la secuencia del gen S del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) o una secuencia derivada de dicho gen que contiene, al menos, uno de los sitios antigénicos de la proteína S del VGPT. Estos adenovirus recombinantes pueden utilizarse en la formulación de vacunas para proteger al ganado porcino de la infección por VGPT y contra la enfermedad causada por dicho virus. Esta invención tiene interés en Veterinaria.			

copy front
 sheet only
 Abstract

ADENOVIRUS RECOMBINANTES QUE EXPRESAN ANTIGENOS DEL VIRUS DE LA GASTROENTERITIS PORCINA TRANSMISIBLE (VGPT) Y SU EMPLEO EN LA FORMULACIÓN DE VACUNAS

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a unos adenovirus recombinantes que contienen en su genoma la secuencia del gen S del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) o secuencias derivadas de dicho gen. La invención también se
10 refiere a unas vacunas recombinantes capaces de proteger eficazmente de la infección causada por el VGPT que comprenden, al menos, uno de dichos adenovirus recombinantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) pertenece a la familia *Coronaviridae*. Este virus infecta a los tejidos respiratorios y entéricos de los cerdos, produciendo una grave enfermedad en el tracto intestinal. La gastroenteritis porcina transmisible (GPT) se
20 describió en primer lugar en los Estados Unidos en 1935 [Smith, H.C., Vet. Med. 51, 425 (1956)]. Los cerdos importados colaboraron en la diseminación del virus a lo largo de todos los países europeos. Desde entonces, se ha detectado la GPT en todos los continentes. Esta enfermedad
25 produce una severa pérdida económica, provocando un 100% de mortalidad en los lechones de menos de 14 días. En los cerdos jóvenes, de entre 2 y 8 semanas, la mortalidad no es tan alta aunque problemas relacionados con el retraso en el crecimiento de los animales infectados producen unas pérdidas
30 importantes.

El VGPT tiene cuatro proteínas estructurales: la proteína S o formadora de espigas, la proteína N o nucleoproteína, la proteína M o proteína de membrana, y la proteína SM o segunda proteína de membrana. La inducción de
35 anticuerpos neutralizantes se produce principalmente por

medio de la glicoproteína S del VGPT [Garwes, D.J. et al., Vet. Microbiol. 3, 179 (1978)]. Se han definido cuatro sitios antigénicos, denominados C, B, D y A, en la proteína S desde el extremo amino al carboxilo, todos ellos localizados en la zona globular de la proteína [Correa et al., J. Gen. Virol. 5 71, 271 (1990); Gebauer et al., Virology 183, 225 (1991)]. Los sitios A, D y B son los responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes [Delmas, B. et al., J. Gen. Virol. 67, 1405 (1986); Jiménez, G. et al., J. Virol. 60, 131 10 (1986); Suñé, C., et al., Virology 177, 559 (1990)]. Adicionalmente, el sitio A está, aparentemente, implicado en la inducción de protección *in vivo* [de Diego, M. et al., J. Virol. 66, 6502 (1992)], aunque se desconoce el papel exacto que desempeñan los diferentes sitios antigénicos en la 15 inducción de resistencia frente al VGPT [Enjuanes, L. and Van der Zeijst, B.A.M., 1995, en (S.G. Siddel ed.) "Coronavirus", publicación inminente].

Las principales pérdidas económicas producidas por el VGPT se deben a la elevada tasa de mortalidad de los lechones 20 en los primeros días de vida, ya que estos animales todavía no han desarrollado un sistema inmune completamente funcional que les proteja eficazmente contra la infección por VGPT, lo que hace necesaria la protección pasiva vía la leche materna. Hasta la fecha, los numerosos intentos realizados para 25 obtener una vacuna contra el VGPT no han producido una protección eficaz contra el VGPT en los lechones. Existen vacunas atenuadas contra el VGPT aunque su eficacia es cuestionable. La mayoría de dichas vacunas se ha obtenido mediante pases seriados sobre cultivos celulares, al objeto 30 de que pierdan su patogenicidad, aunque con ello se ha puesto de manifiesto que también pierden su inmunogenicidad. El equilibrio estaría en averiguar el número de pases adecuado, lo cual no es fácil. Por otra parte, el empleo de vacunas atenuadas no es recomendable ya que dichas vacunas pueden 35 ayudar a diseminar la enfermedad correspondiente puesto que,

mediante los sucesivos pases, algunas cepas pueden revertir a la virulencia. Por tanto, para solucionar el problema existente relativo a la falta de unas vacunas eficaces y adecuadas contra el VGPT, esta invención proporciona unas
5 vacunas recombinantes que no requieren el manejo del virus completo, sino sólo una parte del mismo, con lo que el riesgo de una posible liberación accidental del virus o de que revierta su virulencia desaparece, lo que supone una ventaja considerable contra las vacunas atenuadas existentes.

10 Los adenovirus forman un grupo viral que comprende más de 100 serotipos diferentes, que se caracterizan por la producción de infecciones entéricas y respiratorias en una gran variedad de especies animales, incluyendo el hombre. Los adenovirus humanos se han clasificado en seis sub-géneros (A-
15 F), de los cuales el sub-género C, que comprende los adenovirus 2 y 5, ha sido ampliamente caracterizado. En los últimos años, los adenovirus se han utilizado frecuentemente como vectores de expresión de proteínas heterólogas en células de mamíferos y, recientemente, se ha propuesto su
20 posible empleo como vacunas recombinantes por vía oral. Entre las razones que han conducido al estudio de los adenovirus como vacunas potenciales para la inducción de inmunidad secretoria están su tropismo entérico o respiratorio y la posibilidad de utilizarlos para expresar genes heterólogos
25 con elevada eficacia. Estos virus se han estudiado como modelo para la replicación, transcripción y procesamiento del ARN mensajero, proporcionando una extensa fuente de conocimiento sobre su biología. Este hecho, junto con la facilidad con la que se puede manipular su genoma (ADN de
30 doble banda) mediante técnicas recombinantes sencillas y al elevado rendimiento obtenido en la producción de virus *in vitro*, han motivado el estudio de este tipo de vacunas.

Los adenovirus 4 y 7 se han utilizado en los Estados Unidos como vacunas frente a infecciones respiratorias
35 agudas, aunque su administración se ha limitado a personal

militar. Este tipo de vacunas ha demostrado ser altamente segura y eficiente, reduciendo alrededor de un 80% la incidencia de las infecciones respiratorias agudas relacionadas con los adenovirus. Asimismo, se han utilizado formas recombinantes del adenovirus 5 (Ad5) que portan secuencias de glicoproteínas heterólogas del virus del herpes simple (HSV), del virus de la estomatitis vesicular (VSV) o del virus de la rabia para inducir anticuerpos neutralizantes en especies tan variadas como monos rhesus, ganado vacuno, perros, zorras, mofetas, mapaches, hámsters y ratones [Graham and Prevec, 1992, en (R.W. Ellis ed.) "Vaccines: New Approaches to Immunological Problems", págs. 363-385].

La construcción de los adenovirus recombinantes se basa en la inserción de los genes heterólogos en el genoma viral. A menudo ésto requiere la delección de regiones del genoma que no son esenciales para su infectividad. Se ha podido demostrar que el virión de los adenovirus tiene la capacidad de encerrar dentro de la cápsida hasta un 105% de la longitud del ADN genómico del virus parental, lo que permite introducir insertos de hasta 2 kilobases (kb) en el caso de Ad5, sin necesidad de realizar delecciones compensatorias (el tamaño total del genoma de Ad5 es de 36 kb) [Bett, A.J. et al., J. Virol. 67, 5911 (1993)]. Mediante la introducción de delecciones en la región temprana 3 (E3), se pueden construir vectores recombinantes con insertos mayores. Se ha podido comprobar que la región E3 no es esencial para la replicación viral en células normalmente permisivas. Se han generado vectores que contienen delecciones de 1,88 kb (pFG144K3) y 2,69 kb (pAB14) en la región E3, que permitieron clonar genes heterólogos de hasta 3,9 y 4,7 kb, respectivamente [Bett, A.J. et al., J. Virol. 67, 5911 (1993)].

Ante la falta de una protección eficaz contra el VGPT en los lechones, la presente invención proporciona unos adenovirus recombinantes que expresan antígenos del VGPT que pueden ser utilizados en la formulación de vacunas contra el

VGPT. No se conocen adenovirus recombinantes que contengan la secuencia total o parcial del gen que codifica para la proteína S (gen S) del genoma del VGPT.

Por tanto, un primer objeto de esta invención lo
5 constituyen unos adenovirus recombinantes que contienen en su genoma la secuencia del gen S del VGPT o secuencias derivadas de dicho gen. Preferentemente, dichas secuencias contienen, al menos, uno de los sitios antigénicos de dicha proteína S. Las proteínas recombinantes del VGPT expresadas por dichos
10 adenovirus recombinantes también constituyen un objeto adicional de esta invención.

Otro objeto de esta invención lo constituyen unas vacunas recombinantes capaces de proteger eficazmente de la infección causada por el VGPT que comprenden una cantidad
15 efectiva de, al menos, uno de los adenovirus recombinantes arriba mencionados junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha vacuna contra el VGPT es capaz de proteger a los lechones mediante la inducción de una inmunidad lactogénica.

Otros objetos adicionales de esta invención lo constituyen un método para inmunizar cerdos contra VGPT que comprende la administración de, al menos, uno de los adenovirus recombinantes antes citados, así como un método
20 para la protección de lechones contra VGPT y la enfermedad causada por dicho virus, que comprende la administración de,
25 al menos, uno de los adenovirus recombinantes antes citados a cerdas antes de o durante el periodo de gestación.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

30 La Figura 1 muestra los plásmidos utilizados en la construcción de los adenovirus recombinantes Ad-TS proporcionados por esta invención. En esta figura, "um" significa las unidades de mapa en el mapa de Ad5; E1⁻ y E3⁻ hacen referencia a la delección en los genes correspondientes
35 (E1 y E3); y Δ indica una delección cuyo tamaño se indica

mediante el número que se escribe a su lado.

La Figura 2 muestra la estrategia seguida para el clonaje del gen S del VGPT en Ad5. En esta figura, "An" indica las señales de poliadenilación; "E.R."; endonucleasa de restricción; "Pr", promotor; "TS", referido a secuencias derivadas del gen S del VGPT; "um", unidades de mapa en el mapa de Ad5; Δ E3, una delección en el gen E3.

La Figura 3 es una representación de los fragmentos del gen S del VGPT clonados en Ad5. En esta figura, los números escritos en el interior de las barras indican los nucleótidos de los extremos 5' y 3' de los fragmentos del gen S clonados en Ad5; "An", "Pr" y "TS" tienen el mismo significado que en la Figura 2.

La Figura 4 muestra los resultados de la inducción de anticuerpos contra el VGPT en hámsters inoculados con los recombinantes Ad-TS. El título en RIA se definió como la inversa del logaritmo decimal de la mayor dilución que da una unión tres veces superior al control negativo. El índice de neutralización se definió como el cociente entre el número de unidades formadoras de placa (ufp) en presencia de suero preinmune y el número de ufp en presencia de suero inmune. Las flechas indican los días en que los animales fueron inoculados.

La Figura 5 muestra los resultados de la inducción de anticuerpos contra el VGPT en el suero y en la leche de hámsters inmunizados con los recombinantes Ad-TS durante la lactancia. El título en RIA y el índice de neutralización se definieron como en la Figura 4.

La Figura 6 muestra los resultados de la inducción de anticuerpos contra el VGPT en cerdos inoculados con los recombinantes Ad-TS. El título en RIA y el índice de neutralización se definieron como en la Figura 4. Las flechas indican los días en que los animales fueron inoculados.

La Figura 7 muestra los resultados de protección *in vivo* contra el VGPT con antisueros de cerdo inducidos con los

recombinantes Ad-TS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La construcción de los adenovirus recombinantes
5 conteniendo secuencias derivadas del gen S del VGPT, en
adelante recombinantes Ad-TS, que contienen, al menos, uno de
los sitios antigénicos (A, B, C, D) de la proteína S del
VGPT, preferentemente 2, más preferentemente 3, y todavía más
preferentemente, los 4 sitios antigénicos definidos, se
10 muestra en las Figuras 1 a 3 y se explica de forma detallada
en el Ejemplo 1 donde se describe la obtención de cuatro
recombinantes Ad5-VGPT que contienen las secuencias del gen
S de VGPT desde el nucleótido -8 (considerando la A del codon
de iniciación ATG como el nucleótido 1) al 1135 (Ad-TS-8), al
15 1587 (Ad-TS-5), al 3329 (Ad-TS-9) y al 4470 (Ad-TS-06)
(Figura 3).

Para determinar la expresión de antígenos de la proteína
S del VGPT en células de cerdo en cultivo infectadas con los
recombinantes Ad-TS obtenidos se efectuaron ensayos de
20 inmunofluorescencia, inmunoprecipitación e inmunodetección en
papel de nitrocelulosa después de electroforesis (Ejemplo 2).
Estos ensayos permitieron caracterizar antigénicamente los
productos de expresión de los recombinantes obtenidos y
conocer si dichos recombinantes expresaban correctamente los
25 sitios antigénicos contenidos en ellos. Los productos de
expresión de dichos adenovirus recombinantes, o proteínas
recombinantes del VGPT, comprenden la secuencia total o
parcial de la proteína S del VGPT, y pueden tener, al menos,
uno de los sitios antigénicos de la proteína S del VGPT,
30 preferentemente 2, más preferentemente 3, y todavía más
preferentemente, los 4 sitios antigénicos definidos de la
proteína S definidos. La expresión de estas proteínas
recombinantes puede confirmarse en células 293 [ATCC CRL
1573] o en células de testículo de cerdo (ST). Estas
35 proteínas recombinantes del VGPT son reconocidas por los

anticuerpos monoclonales dirigidos contra los sitios antigénicos que contienen.

A continuación se estudió la respuesta inmune sistémica inducida por los diferentes recombinantes Ad-TS obtenidos en hámsters (Ejemplo 3). Para ello se inmunizaron hámsters con dicho recombinantes Ad-TS. El título de anticuerpos anti-VGPT contenidos en las muestras de suero recogidas se determinó por un radioinmunoensayo (RIA) así como por la capacidad para neutralizar la infectividad del VGPT *in vitro*. Los resultados obtenidos (Figura 4) ponen de manifiesto que, tras la segunda inmunización todos los recombinantes habían inducido antisueros con títulos en RIA superiores a 3.000 y con unas relaciones de neutralización de entre 1 y 2,5.

La respuesta inmune lactogénica se estudió en hembras inmunizadas con los recombinantes Ad-TS apareadas con machos que no eran inmunes. La presencia de anticuerpos específicos anti-VGPT en la leche y en el suero de las hembras amamantadoras se determinó por RIA y por neutralización. Los resultados demostraron (Figura 5) que los recombinantes estudiados inducían anticuerpos frente al VGPT en la leche y en el suero que además neutralizaban al VGPT *in vitro*.

La capacidad de los recombinantes Ad-TS para inducir una respuesta inmune en cerdos se describe en el Ejemplo 4. Para ello se inmunizaron cerdos de 4 semanas con los recombinantes Ad-TS obtenidos. El título de anticuerpos anti-VGPT en las muestras de suero de los animales inmunizados se determinó por un RIA, así como por la capacidad para neutralizar la infectividad del VGPT *in vitro*. Los resultados obtenidos (Figura 6), ponen de manifiesto que después de la tercera inmunización, todos los recombinantes Ad-TS habían inducido antisueros con títulos en RIA superiores a 10.000 y con unas relaciones de neutralización de entre 1 y 6.

Para estudiar la capacidad protectora *in vivo* contra el VGPT de los antisueros inducidos en cerdos por los recombinantes Ad-TS (Ejemplo 5), se incubaron alícuotas de

una cepa de VGPT virulenta con cada uno de los antisueros inducidos por dichos recombinantes Ad-TS. La mezcla resultante se administró a unos cerdos de 2 días, altamente susceptibles al VGPT y progenie de madres seronegativas al VGPT. El título del virus en distintos tejidos se determinó los días 1 y 2 post infección y el día de su fallecimiento. Los resultados (Figura 7) muestran que los animales tratados con sueros inducidos por los recombinantes que contenían los cuatro sitios antigénicos de la proteína S estaban completamente protegidos contra la infección por VGPT.

En el Ejemplo 6 se describe un ensayo para comprobar el tropismo de recombinantes basados en Ad5 que puso de manifiesto que dichos recombinantes son vectores ideales para inducir inmunidad lactogénica en cerdos debido a que su tropismo facilita la presentación de antígenos recombinantes en tejidos linfoepiteliales asociados con el tracto gastrointestinal (GALT) o con el tracto respiratorio (BALT).

Para evaluar el posible empleo de los recombinantes Ad-TS obtenidos con fines vacunales, se estudiaron los posibles efectos patológicos producidos por la infección con dichos recombinantes (Ejemplo 7). El estudio histopatológico realizado en tejidos de cerdos que habían sido infectados con dichos recombinantes puso de manifiesto que todos los animales infectados desarrollaron una patología pulmonar ligera aunque a lo largo de todo el experimento ninguno de los animales inoculados con los diferentes recombinantes Ad-TS manifestó ningún tipo de signo clínico o pérdida de apetito. Adicionalmente, no se detectaron alteraciones patológicas significativas a nivel macroscópico o microscópico cuando se sacrificaron los animales. Estos datos confirman que los recombinantes basados en adenovirus que contienen la secuencia del gen S del VGPT o secuencias derivadas de la misma, constituyen una vacuna eficaz para la inducción de inmunidad lactogénica contra GPT.

Las nuevas vacunas recombinantes capaces de proteger

eficazmente al ganado porcino de la infección causada por el VGPT, proporcionadas por esta invención, comprenden, como antígeno, al menos un adenovirus recombinante que contiene la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de la misma, junto con, opcionalmente, un excipiente aceptable farmacéuticamente.

En general, estas vacunas pueden contener una cantidad de antígeno capaz de introducir en el animal a inmunizar un título de adenovirus recombinante de, al menos, 10^9 ufp, preferentemente comprendido entre 10^9 y 10^{10} ufp.

Como excipiente puede utilizarse un diluyente tal como suero salino fisiológico o suero salino fisiológico con 10% de glicerol u otras soluciones salinas similares. Asimismo, estas vacunas pueden contener también un adyuvante de los habitualmente utilizados en la formulación de vacunas, tanto acuoso, tal como hidróxido de aluminio, suspensiones de geles de alúmina y similares, como oleosos, a base de aceites minerales, glicéridos y derivados de ácido graso.

Estas vacunas recombinantes pueden prepararse suspendiendo los adenovirus recombinantes en el excipiente farmacéuticamente aceptable. Si dichos adenovirus estuvieran en forma liofilizada, se podrían resuspender en dicho excipiente.

Adicionalmente, esta invención proporciona vacunas multivalentes capaces de prevenir la enfermedad provocada por el VGPT y otras infecciones. Estas vacunas comprenden, además de un adenovirus recombinante que contiene la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de la misma, un antígeno capaz de inducir una protección contra un virus u otro agente patógeno del ganado porcino, y un excipiente aceptable farmacéuticamente. Dichos virus o agentes patógenos se seleccionan, preferentemente, entre aquéllos que entran en el animal vía mucosas o se replican en éstas, por ejemplo, rotavirus, el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP o PEDV), el virus causante del síndrome respiratorio y

reproductivo porcino (PRRS), *Clostridium* sp., *Serpulina hydiosenteriae*, *Pseudorabies* (agente causal de la enfermedad de Aujeszky), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Escherichia coli*, y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa. Estas vacunas multivalentes pueden elaborarse insertando los genes que codifican para los antígenos correspondientes en el mismo adenovirus recombinante que contiene la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de la misma, o bien construyendo recombinantes independientes que posteriormente se mezclarían para su co-inoculación.

Alternativamente, la vacuna recombinante proporcionada por esta invención se puede utilizar en combinación con otras vacunas convencionales, ya sea formando parte de las mismas o bien como diluyente o fracción liofilizada para diluirse con otras vacunas ya sean convencionales o recombinantes.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden administrarse al animal por vía oral, nasal o intraperitoneal, preferentemente, por vía oronasal.

El adenovirus recombinante puede presentarse bien en forma de solución o suspensión con un excipiente adecuado o bien en forma liofilizada, reconstituyéndose en este caso el producto final con un diluyente, adyuvante o cualquier otro tipo de vacuna acuosa u oleosa que se aplique al animal.

Adicionalmente, la invención proporciona un método para la inmunización de cerdos contra VGPT que consiste en la administración oral, nasal o intraperitoneal, o formas combinadas de estas vías, a dichos cerdos, bien de un adenovirus recombinante que contiene en su genoma la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de dicho gen o bien de una vacuna contra VGPT que incluye una cantidad inmunológicamente eficaz de un adenovirus recombinante que contiene en su genoma la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de dicho gen y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, la invención proporciona un método para proteger lechones contra VGPT y la enfermedad causada por dicho virus, que consiste en la administración oral, nasal o intra-peritoneal, o formas combinadas de estas vías, a cerdas antes
5 de o durante el periodo de gestación, bien de un adenovirus recombinante que contiene en su genoma la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de dicho gen, o bien de una vacuna contra VGPT que incluye una cantidad inmunológicamente eficaz de un adenovirus recombinante que
10 contiene en su genoma la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de dicho gen y un excipiente aceptable farmacéuticamente.

EJEMPLOS

15 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Ejemplo 1

Construcción de los recombinantes Ad-TS

20 El sistema utilizado para el clonaje de los genes heterólogos en adenovirus se basa en el empleo de dos plásmidos que contienen, respectivamente, las mitades izquierda y derecha del genoma de Ad5. El gen o los genes heterólogos a clonar en el adenovirus se introducen
25 normalmente en el plásmido que lleva la parte genómica de la derecha, en donde se encuentra la delección de E3. Cuando ambos plásmidos se co-transfectan en células eucarióticas, se pueden recombinar, dando lugar al genoma completo de un adenovirus infectivo que lleva el gen o genes heterólogos. La
30 estructura genética de los tres plásmidos (pFG144K3, pAB14 y pFG173), clave para la construcción de los adenovirus recombinantes, ya ha sido descrita previamente [Bett, A.J. et al., J. Virol. 67, 5911 (1993); Mittal, S.K., et al., Virus Res. 28, 67 (1993)] y se resume en la Figura 1. El plásmido
35 pFG144K3, que tiene 14,72 kb, deriva del pFG144 [Ghosh-

Choudhury, G., et al., Gene 50, 161 (1986)]. Dicho plásmido pFG144K3 contiene las secuencias del lado izquierdo del genoma de Ad5, que incluye las unidades de mapa (um) desde 0 hasta 16,1, con una delección en la región E1 de 3,47 kb (unidades de mapa 1 a 10,6), y las secuencias del lado derecho del genoma, que abarcan las unidades de mapa 70 a 100, con una delección en la región E3 de 1,88 kb (unidades de mapa 79,6 a 84,8). Esta última delección deja un único sitio Xba I, que se utiliza para el clonaje de los genes heterólogos. El plásmido pAB14 también contiene secuencias del lado izquierdo del genoma de Ad5 pero, a diferencia del pFG144K3, la delección en la región E3 es de 2,69 kb (unidades de mapa 78,3 a 85,8). El plásmido pFG173 contiene la mitad izquierda funcional del Ad5. Este plásmido tiene una delección en la región L4-E3 de 3,2 kb, localizada exactamente entre las unidades de mapa 75,9 y 84,9 del genoma de Ad5, que elimina la infectividad del plásmido y, por sí mismo, no es capaz de generar adenovirus infectivos.

La estrategia seguida para producir los adenovirus recombinantes que contienen los fragmentos del gen S del VGPT se muestra en la Figura 2. Como puede apreciarse, el gen S se clonó en un plásmido Bluescript (Stratagene) o pYA, tal como se ha descrito previamente [Gebauer et al., Virology 183, 225 (1991)]. El ADN de los plásmidos se preparó utilizando el método de lisis alcalina [Birnboim, H.C y Doly, J., Nucleic Acids Research 7, 1513, (1979)], y se purificó y centrifugó en un gradiente de densidad de cloruro de cesio. En algunos casos, las secuencias del gen S se flanquearon por el promotor (Pr) del SV40 y por secuencias de poliadenilación (An), tal como se recoge en la Figura 3. En estos casos, los fragmentos del gen S se subclonaron primero en los plásmidos pSV2X3 o pSV2X4 [Prevec, L., et al., J. Inf. Dis. 161, 227 (1990)] y posteriormente se retiraron las secuencias flanqueantes del promotor de SV40 y de poliadenilación utilizando las enzimas de restricción que se recogen en la

Tabla 1.

Tabla 1

Clonaje de fragmentos del gen S en Ad5

5	<u>Recombinante</u>	<u>Sitios de escisión en el plásmido original</u>	<u>Plásmido intermedio/ sitios de clonaje</u>	<u>Sitios de escisión del plásmido intermedio</u>
	Ad-TS-2	Bluescript/XhoI	pSV2X3/XhoI	XbaI
10	Ad-TS-8	Bluescript/XhoI	pSV2X3/XhoI	StuI/XbaI
	Ad-TS-01	Bluescript/ApaI/HindIII	pSV2X4/StuI/HindIII	XbaI
	Ad-TS-07	Bluescript/HincII	--	--
	Ad-TS-5	Bluescript/ApaI/HindIII	pSV2X4/StuI/HindIII	XbaI
	Ad-TS-02	Bluescript/ApaI/HindIII	pSV2X4/StuI/HindIII	XbaI
15	Ad-TS-05	pYA/SmaI/HindIII	--	--
	Ad-TS-6	Bluescript/ApaI/HindIII	pSV2X4/StuI/HindIII	XbaI
	Ad-TS-9	pYA/SmaI/HindIII	--	--
	Ad-TS-06	pYA/SmaI/AspI	--	--

20 A continuación, los fragmentos del gen S, flanqueados o no por las secuencias del promotor de SV40 y de poliadenilación, se clonaron en el único sitio Xba I presente en la región E3 parcialmente deleccionada de los plásmidos pFG144K3 o pAB14. Los plásmidos resultantes, denominados

25 pFG144K-TS o pAB-TS, no son capaces de generar Ad5 infectivos por sí mismos, pero, tras co-transfección en células 293 con el plásmido pFG173, que contiene la mitad 5' funcional del Ad5, son capaces de generar Ad5 infectivos que portan la secuencia del gen S clonada (véanse las Figuras 1 y 2). La

30 co-transfección se realizó mediante el método de precipitación con fosfato cálcico [Graham, F. y van der EB, A., J. Virology 52, 456 (1973)]. Al cabo de 8 a 15 días post co-transfección, se aislaron las placas y se crecieron, y a continuación, el ADN viral se analizó con Hind III. Los virus

35 que presentaban el patrón esperado se plaquearon y se purificaron tres veces. Finalmente, se verificó la estructura

primaria, secuenciando las zonas de unión de las construcciones. De esta manera, se obtuvieron cuatro recombinantes Ad5-VGPT que contenían las secuencias del gen S de VGPT desde el nucleótido -8 (considerando la A del codon de iniciación ATG como el nucleótido 1) al 1135 (Ad-TS-8), 1587 (Ad-TS-5), 3329 (Ad-TS-9) y 4470 (Ad-TS-06). Estos recombinantes codifican para fragmentos de 378, 529, 1109 y 1490 aminoácidos (véase la Figura 3).

10

Ejemplo 2

Experimentos de expresión de proteínas S del VGPT en células de cerdo en cultivo infectadas con los recombinantes Ad-TS

Se han realizado tres tipos de experimentos para determinar la expresión de antígenos de la proteína S del VGPT, concretamente:

a. Inmunofluorescencia. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón, específicos para los distintos sitios antigénicos (A, B, C D) de la proteína S para detectar los productos de expresión en células en cultivo infectadas con los recombinantes Ad-TS. El marcaje se realizó con anticuerpos anti-Ig de ratón marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El método utilizado fue el descrito por Sanz et al., [J. Virol. 54, 199 (1985)].

b. Inmunoprecipitación. Las proteínas, marcadas metabólicamente con ^{35}S -metionina/cisteína (Amersham Ibérica, Código nº SJQ0079), procedentes de células infectadas con los recombinantes Ad-TS, se inmunoprecipitaron con suero porcino anti-VGPT y Sepharosa-proteína A. El inmunoprecipitado se resuspendió en un tampón de electroforesis que contenía 2,5% de dodecilsulfato sódico (SDS) y 5% de 2-mercaptoetanol [Laemmli, U.K., Nature, 227, 680, (1970)] y a continuación se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía. El método utilizado fue el descrito por Sanz et al., [J. Virol. 54, 199 (1985)].

c. Inmunodetección en papel de nitrocelulosa después de

la electroforesis. Los extractos proteicos de células procedentes de células infectadas con los recombinantes Ad-TS se separaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida, e inmediatamente se transfirieron a un papel
5 de nitrocelulosa. Los antígenos de la proteína S se detectaron con anticuerpos monoclonales de ratón específicos para los diferentes sitios antigénicos (A, B, C, D) de la proteína S, un segundo anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón y ^{125}I -proteína A. El método utilizado fue el descrito por
10 Correa et al., [J. Gen. Virol. 71, 271 (1990)].

Estos experimentos permitieron la caracterización antigénica de los productos de expresión de los recombinantes. En primer lugar, la presencia de antígenos de la proteína S se confirmó en células 293 o en células de
15 testículo de cerdo (ST) [McClurkin, A.W., y Norman, J.O., Can. J. Comp. Vet. Sci. 30, 190 (1966)] infectadas con uno cualquiera de los cuatro recombinantes Ad-TS. La localización de estos antígenos en las células infectadas era citoplasmática, predominantemente. En los recombinantes Ad-
20 TS-8, Ad-TS-9 y Ad-TS-06, los productos de expresión fueron reconocidos por los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los sitios antigénicos de la proteína S contenidos por el inserto en su secuencia, pero no fueron reconocidos por aquellos anticuerpos monoclonales dirigidos contra los sitios
25 que no estaban presentes. Este hecho indica que estos recombinantes expresan correctamente los sitios antigénicos contenidos en ellos. Sin embargo, el producto de expresión del recombinante Ad-TS-5 no fue reconocido por los anticuerpos monoclonales específicos del sitio D, aunque este
30 sitio está contenido en la secuencia del inserto, lo que sugería un plegamiento incorrecto de la proteína en esa región. El peso molecular aparente de los productos de expresión de los cuatro recombinantes [68, 86, 135 y 200 kilodaltons (kDa) respectivamente] era más alto que el que se
35 esperaba teniendo en cuenta únicamente el número de

aminoácidos, lo que sugería que estos productos estaban altamente glicosilados, de forma similar a lo que ocurre durante la síntesis de proteína S en la infección con VGPT. En los recombinantes con insertos relativamente pequeños
5 (1135, 1587 y 3329 nucleótidos respectivamente) los niveles de expresión ($>3 \mu\text{g}/10^6$ células) eran más altos que en el recombinante con el inserto más largo (4470 nucleótidos), que contenía el gen S completo ($<1 \mu\text{g}/10^6$ células).

10

Ejemplo 3

Inmunogenicidad de los recombinantes Ad-TS en hámsters

En primer lugar se estudió la respuesta inmune sistémica inducida por los diferentes recombinantes Ad-TS en hámsters. Por ese motivo, se inmunizaron hámsters de 8 semanas con $1,6 \times 10^8$ unidades formadoras de placas (ufp) de los
15 recombinantes Ad-TS distribuidos por tres vías: oral (4×10^8 ufp), nasal (2×10^8 ufp) e intraperitoneal (1×10^8 ufp). Los animales fueron inoculados los días 0, 32, 60 y 90, y se recogieron muestras de suero los días 0, 32, 47, 87, 105 y
20 115. En las muestras de suero, el título de anticuerpos anti-VGPT se determinó por un radioinmunoensayo (RIA) [siguiendo el método previamente descrito por Jiménez, G. et al., J. Virol. 60, 131 (1986)], así como por la capacidad para neutralizar la infectividad del VGPT *in vitro* [de acuerdo con
25 el método descrito por Correa, I., et al., Virus Res. 10, 77 (1988)]. El título en RIA se define como la inversa de la dilución más alta de suero que tiene un valor más alto que el de un suero control negativo; mientras que la relación de neutralización (IN) se define como el logaritmo decimal
30 (\log_{10}) del cociente entre ufp después de la incubación en ausencia y en presencia del suero indicado. Los títulos en RIA y las relaciones de neutralización de los antisueros inducidos por los cuatro recombinantes Ad-TS se representan en base al periodo de tiempo transcurrido desde la primera
35 inmunización (Figura 4). Como puede apreciarse, tras la

segunda inmunización todos los recombinantes habían inducido antisueros con títulos en RIA superiores a 3.000 y con unas relaciones de neutralización de entre 1 y 2,5.

Al objeto de estudiar la respuesta inmune lactogénica, las hembras, inmunizadas tres veces con los recombinantes Ad-TS, se aparearon con machos que no eran inmunes. Unos 10 días antes del parto, la hembras fueron re-inoculadas con otra dosis del recombinante Ad-TS correspondiente. Entre 24 y 48 horas después del parto, se administraron a las hembras amamantadoras 10 unidades internacionales (UI) de oxitocina y 1 hora más tarde, se recogió la leche aplicando vacío con una jeringa. La presencia de anticuerpos específicos anti-VGPT en la leche y en el suero de las hembras amamantadoras se determinó, como en el caso anterior, por RIA y por neutralización. Los resultados demostraron (Figura 5) que los recombinantes estudiados (Ad-TS-8, Ad-TS-9 y Ad-TS-06) inducían anticuerpos frente al VGPT en la leche con títulos que oscilaban entre 2×10^3 y 3×10^3 , mientras que en el suero los títulos oscilaban entre 5×10^3 y $1,5 \times 10^4$. Adicionalmente, estos anticuerpos neutralizaban al VGPT *in vitro* con una relación de neutralización de aproximadamente 1 en la leche y entre 2 y 4 en el suero. Los animales inmunizados con Ad5 desprovisto de inserto (siguiendo el mismo protocolo de inmunización que para los recombinantes Ad-TS) no indujeron ningún tipo de respuesta anti-VGPT.

Ejemplo 4

Inmunogenicidad de los recombinantes Ad-TS en cerdos

A continuación, se realizó un estudio sobre la capacidad de los recombinantes Ad-TS para inducir una respuesta inmune en cerdos. Por ese motivo, se inmunizaron cerdos de 4 semanas con 4×10^9 ufp de los recombinantes Ad-TS distribuidos por tres vías: oral (1×10^9 ufp), nasal (1×10^9 ufp) e intraperitoneal (2×10^9 ufp). Los animales fueron inoculados los días 0, 28 y 56 y se recogieron muestras de suero los

días 0, 28, 42, 56 y 70. En las muestras de suero, el título de anticuerpos anti-VGPT se determinó por un RIA [siguiendo el método previamente descrito por Jiménez, G. et al., J. Virol. 60, 131 (1986)], así como por la capacidad para neutralizar la infectividad del VGPT *in vitro* [de acuerdo con el método descrito por Correa, I., et al., Virus Res. 10, 77 (1988)]. Los títulos en RIA y las relaciones de neutralización de los antisueros inducidos por los cuatro recombinantes Ad-TS se han representado en base al periodo de tiempo transcurrido desde la primera inmunización (Figura 6). Como puede apreciarse, tras la tercera inmunización, todos los recombinantes habían inducido antisueros con títulos en RIA superiores a 10.000 y con unas relaciones de neutralización de entre 1 y 6. Es interesante observar que todos los recombinantes eran más inmunogénicos en cerdos que en hámsters, que los títulos de anticuerpo en RIA eran más altos y, adicionalmente, que estos anticuerpos eran más neutralizantes.

20

Ejemplo 5

Protección *in vivo* contra el VGPT con sueros de cerdos inducidos por los recombinantes Ad-TS

Para estudiar la capacidad protectora *in vivo* contra el VGPT de los antisueros inducidos en cerdos por los recombinantes Ad-TS, se incubaron alícuotas de 10^7 ufp de una cepa de VGPT virulenta (PUR-46-SW11-ST2) a 37°C durante 60 minutos con 3 ml de cada uno de los antisueros inducidos por los cuatro recombinantes. Una vez que el periodo de incubación había transcurrido, la mezcla se administró con una boquilla intragástrica en cerdos de 2 días, altamente susceptibles al VGPT y progenie de madres seronegativas al VGPT. Los animales inoculados se alimentaron tres veces al día con leche para lactantes (Nidina 1, Nestlé) suplementada con 3 ml del antisuero correspondiente. Los animales control se trataron de forma similar, pero utilizando un suero

inducido por Ad5 desprovisto de inserto. El título del virus en los extractos de yeyuno-íleo, ganglios mesentéricos, pulmón, y ganglios mediastínicos, se determinó los días 1 y 2 post infección y el día del fallecimiento (los animales que no murieron se sacrificaron el día 5 post infección). Para la determinación del título de virus en los tejidos, las muestras de dichos tejidos se homogeneizaron en suero salino frío (1:1, v:v) con un homogeneizador OMNI 2000 (Omni International) y el título de virus infectivo se determinó mediante plaqueo en células 293 [Bett et al., J. Virol. 67, 5911 (1993)]. Los resultados (Figura 7) muestran que los animales tratados con sueros inducidos por los recombinantes que contenían los cuatro sitios antigénicos de la proteína S (Ad-TS-9 y Ad-TS-06) estaban completamente protegidos contra la infección por VGPT. Los títulos de los virus en los grupos tratados con estos dos antisueros eran muy bajos ($<10^2$ ufp/g de tejido) en todos los tejidos. Además, no se observó en estos grupos ni mortalidad ni ningún tipo de signos clínicos. Sin embargo, los antisueros inducidos con los recombinantes Ad-TS-5 y con Ad-TS-8 protegían tan sólo parcialmente. Los títulos de virus infectivo en todos los tejidos ($10^1 - 10^3$ ufp/g en el grupo tratado con el antisuero de Ad-TS-5 y $10^2 - 10^4$ ufp/g en el grupo tratado con el antisuero de Ad-TS-8) eran más bajos que en el grupo tratado con el suero control inducido por Ad5 desprovisto de inserto. En estos dos grupos, se observó enteritis y muerte más tarde que en el grupo control; y al final, el índice de mortalidad fue del 100%. Estos resultados implican que el sitio A de la proteína S del VGPT u otros sitios no contenidos en estos recombinantes son necesarios para la inducción de protección total contra el VGPT. Asimismo, los resultados también muestran que, en ausencia de este sitio antigénico, los fragmentos de la proteína S que incluyen los sitios C+B o C+B+D sólo inducen anticuerpos que protegen parcialmente contra el VGPT.

Ejemplo 6

Tropismo en cerdos de los recombinantes basados en Ad5

La inmunidad lactogénica es especialmente eficiente cuando la presentación de los antígenos se realiza en tejidos linfopiteliales especializados asociados con el tracto gastrointestinal (GALT) o con el tracto respiratorio (BALT). Uno de los objetivos fundamentales de esta invención es el de inducir una respuesta inmune lactogénica contra el VGPT utilizando recombinantes Ad-TS. Por tanto, la eficacia de esta invención depende de la capacidad de estos recombinantes para infectar y expresar antígenos de VGPT en los tejidos previamente mencionados (GALT y/o BALT). Para estudiar el tropismo de Ad5 en cerdos, se ha utilizado un Ad5 recombinante que contenía la región E3 del gen de la luciferasa (Ad-luc) que había sido construido y caracterizado previamente [Mittal, S.K., et al., Virus Res. 28, 67 (1993)]. Este recombinante se construyó utilizando el mismo sistema que para la obtención de los recombinantes Ad-TS, tal como se menciona en esta descripción. El producto del gen heterólogo clonado en este recombinante (luciferasa) es fácilmente detectable por medio de una reacción enzimática sencilla y sensible, en presencia de su sustrato, luciferina. Todo esto convierte al recombinante en una herramienta útil, no sólo para la determinación de los tejidos que infecta sino también para estimar los niveles de antígeno expresados en cada uno de los tejidos.

Para realizar este estudio, cerdos de 4 semanas fueron inoculados con diferentes dosis (1×10^8 - 1×10^{10} ufp/animal) de Ad-luc por diferentes vías (oronasal, intraperitoneal, entérica e intravenosa), dejando que la infección progresara durante varios días (1 - 7). Transcurrido ese tiempo, los animales fueron sacrificados y se recogieron muestras de distintos tejidos. Estos tejidos se homogeneizaron tal como se ha mencionado previamente, en suero salino frío (1:1, v:v) con un homogeneizador OMNI 2000 (Omni International) y se

determinó el título del virus infectivo mediante plaqueo en células 293; la actividad de la luciferasa se determinó siguiendo el método previamente descrito [Mittal, S.K., et al., Virus Res. 28, 67 (1993)]. Simultáneamente, se
5 recogieron muestras para estudiar el tropismo a nivel de tejidos y células mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína del Ad5, concretamente, el anticuerpo monoclonal H2-19 que reconoce específicamente una proteína de 72 kDa del
10 adenovirus [Branton et al., Cell Biol. 63, 941 (1985)]. Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto:

a) que los recombinantes basados en Ad5 infectan principalmente a los pulmones, ganglios mediastínicos, intestino, y ganglios mesentéricos de los cerdos, expresando
15 en estos tejidos los productos codificados por las secuencias heterólogas contenidas en ellos;

b) que la infección con estos recombinantes implica la producción de virus infectivo en pulmones, ganglios mediastínicos y ganglios mesentéricos, pero no en el
20 intestino, lo que sugiere que la infección en este último órgano es abortiva;

c) que el tropismo en cerdos de estos recombinantes depende de la vía de inoculación: tropismo respiratorio cuando la inoculación es oronasal, pero tropismo intestinal
25 cuando la inoculación es intraperitoneal;

d) que, después de la inoculación, la expresión de los productos codificados por las secuencias heterólogas contenidas en ellos alcanza su pico entre los días 1 y 2 post infección, en todos los tejidos, disminuyendo rápidamente
30 hasta unos valores muy bajos o nulos alrededor del día 7 post infección.

Este tropismo facilita la presentación de antígenos recombinantes en tejidos linfoepiteliales asociados con el tracto gastrointestinal (GALT) o con el tracto respiratorio
35 (BALT) convirtiendo a los recombinantes basados en Ad5 en

vectores ideales para la inducción de inmunidad lactogénica en cerdos.

Ejemplo 7

5 Estudio sobre la posible patología producida en cerdos por los recombinantes basados en Ad5

El empleo de recombinantes Ad-TS como vacuna requiere conocer los posibles efectos patológicos producidos por la infección con estos vectores. Para ello, se realizó un
10 detallado estudio histopatológico en tejidos de cerdos que habían sido infectados con estos recombinantes. Para la realización de este estudio, cerdos de 4 semanas fueron inoculados con diferentes dosis (1×10^6 - 1×10^{10} ufp/animal) de los recombinantes Ad-TS, simultáneamente por vía oronasal e
15 intraperitoneal, dejando que la infección progresara durante varios días (1 - 10). Transcurrido este tiempo, los animales fueron sacrificados y se recogieron muestras de distintos tejidos para el estudio histopatológico. Todos los animales infectados con los recombinantes Ad-TS desarrollaron una
20 patología pulmonar ligera, mientras que en otros órganos, la patología era inexistente o escasamente presente, es decir, congestión esplénica e hiperplasia folicular linfoide en ganglios mesentéricos y mediastínicos. La magnitud de las alteraciones patológicas observada en pulmones estaba en
25 relación directa con la dosis, pero tales alteraciones eran cuantitativamente similares en todas las dosis analizadas. Se observó neumonía lobular, de localización característica en los lóbulos superior y medio, preferentemente en el pulmón derecho. Después de 24 horas post infección, se observó
30 abundante infiltración inflamatoria, especialmente de células mononucleares a nivel intersticial, con un espesamiento de las paredes alveolares y una congestión vascular también de distribución focal. A nivel bronquial, las alteraciones histopatológicas eran poco significativas, con algunos
35 linfocitos en la lámina propia del epitelio bronquial.

También se observaron macrófagos alveolares muy grandes, con núcleo bizarro de forma irregular, que contenían, en algunos casos, inclusiones basófilas intranucleares. Más esporádicamente, se observaron células de aspecto similar a nivel intersticial. No se detectaron áreas de edema, necrosis o hemorragia. A los 4 - 5 días post infección había una neumonía en fase de resolución y la magnitud de las alteraciones histopatológicas comenzó a disminuir rápidamente. A los 7 - 10 días post infección, la neumonía había desaparecido y no se detectaron alteraciones histopatológicas de ningún tipo.

Otro resultado relevante con respecto a la ligera patología producida en cerdos por los vectores basados en Ad5 era el hecho de que a lo largo de todo el experimento (10 semanas) ninguno de los más de 50 animales inoculados tres veces con 4×10^9 ufp de los diferentes recombinantes Ad-TS (véase el Ejemplo 4) manifestó ningún tipo de signo clínico o pérdida de apetito. Adicionalmente, cuando estos animales se sacrificaron (10 semanas después de la primera inoculación), en ninguno de ellos se detectaron alteraciones patológicas significativas a nivel macroscópico o microscópico.

Por consiguiente, teniendo en cuenta todo lo que se ha mencionado previamente, se puede concluir afirmando que los recombinantes basados en adenovirus que contienen la secuencia del gen S del VGPT o secuencias derivadas de la misma, constituyen una vacuna eficaz para la inducción de inmunidad lactogénica contra la gastroenteritis porcina transmisible. Teniendo en cuenta los resultados de protección *in vivo*, el recombinante Ad-TS-9 es el que se puede utilizar, preferentemente, en la formulación de la vacuna objeto de esta invención. Este recombinante proporciona niveles de protección similares a los del recombinante Ad-TS-06, pero es más estable y se replica mejor *in vitro* ya que tiene un inserto más pequeño.

Ejemplo 8**Preparación de una vacuna contra VGPT en forma liofilizada**

Se infectan células 293 cuando están al 80% de confluencia con un adenovirus recombinante que contiene la
5 secuencia del gen S del VGPT [Ad-TS-9], en un MOI (multiplicity order infectivity, razón de multiplicidad de la infectividad) de 1. A las 72-96 horas post-infección, el 80-90% de las células están redondeadas y son refringentes. Se recoge el cultivo celular y el sobrenadante se somete a dos
10 ciclos de congelación y descongelación y se centrifuga a 2.000g durante 10 minutos al objeto de eliminar los detritus celulares. El sobrenadante se mezcla con un medio de liofilización y se liofiliza el producto de forma que por dosis vacunal haya entre 10^9 y 10^{10} ufp/animal.

15

DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

Uno de los adenovirus recombinantes obtenidos, concretamente el denominado Ad-TS-9, ha sido depositado en la
European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), en
20 Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG (Reino Unido), el 29 de Noviembre de 1995, correspondiéndole el número de acceso V95112928.

REIVINDICACIONES

1. Un adenovirus recombinante caracterizado porque contiene en su genoma la secuencia del gen S del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) o una secuencia derivada de dicho gen.

2. Un adenovirus recombinante según la reivindicación 1, que comprende una secuencia derivada del gen S de VGPT que contiene, al menos, un sitio antigénico de la proteína S del VGPT.

3. Un adenovirus recombinante según la reivindicación 1, que comprende una secuencia derivada del gen S de VGPT que contiene dos sitios antigénicos de la proteína S del VGPT.

4. Un adenovirus recombinante según la reivindicación 1, que comprende una secuencia derivada del gen S de VGPT que contiene tres sitios antigénicos de la proteína S del VGPT.

5. Un adenovirus recombinante según la reivindicación 1, que comprende una secuencia derivada del gen S de VGPT que contiene cuatro sitios antigénicos de la proteína S del VGPT.

6. Un adenovirus recombinante según la reivindicación 1, que comprende una secuencia derivada del gen S de VGPT que se selecciona del grupo formado por:

a) la secuencia del gen S de VPGT desde el nucleótido -8 hasta el 1135;

b) la secuencia del gen S de VPGT desde el nucleótido -8 hasta el 1587;

c) la secuencia del gen S de VPGT desde el nucleótido -8 hasta el 3329; y

d) la secuencia del gen S de VPGT desde el nucleótido -8 hasta el 4470,

en todos los casos considerando la A del codon de iniciación ATG como el nucleótido 1.

7. Una vacuna para proteger al ganado porcino de la infección por el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) y contra la enfermedad causada por dicho virus que comprende una cantidad adecuada de un adenovirus recombinante según las reivindicaciones 1 a 6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

8. Empleo de un adenovirus recombinante que contiene en su genoma la secuencia del gen S del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) o una secuencia derivada de dicho gen, según las reivindicaciones 1 a 6, en la elaboración de una vacuna para proteger al ganado porcino de la infección por el VGPT y contra la enfermedad causada por dicho virus.

9. Una proteína recombinante del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) que comprende la secuencia total o parcial de la proteína S del VGPT.

10. Proteína recombinante según la reivindicación 9, que comprende una secuencia de la proteína S del VGPT que contiene, al menos, un sitio antigénico de dicha proteína S.

11. Proteína recombinante según la reivindicación 9, que comprende una secuencia de la proteína S del VGPT que contiene dos sitios antigénicos de dicha proteína S.

30

12. Proteína recombinante según la reivindicación 9, que comprende una secuencia de la proteína S del VGPT que contiene tres sitios antigénicos de dicha proteína S.

35

13. Proteína recombinante según la reivindicación 9, que

comprende una secuencia de la proteína S del VGPT que contiene cuatro sitios antigénicos de dicha proteína S.

14. Una proteína recombinante del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) que contiene la secuencia total o parcial de la proteína S del VGPT caracterizada porque es obtenible por expresión de un adenovirus recombinante según las reivindicaciones 1 a 6.

15. Una vacuna multivalente capaz de prevenir la enfermedad provocada por el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) y otras infecciones porcinas, que comprende, además de un adenovirus recombinante que contiene la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de la misma, según las reivindicaciones 1 a 6, un antígeno capaz de inducir una protección contra un virus u otro agente patógeno del ganado porcino, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.

16. Una vacuna multivalente según la reivindicación 15, que comprende un adenovirus recombinante que contiene la secuencia del gen S del VGPT o una secuencia derivada de la misma junto con la secuencia de los genes que codifican para los antígenos correspondientes.

17. Una vacuna multivalente según la reivindicación 16, en la que dichos antígenos corresponden a virus o agentes patógenos seleccionados del grupo formado por aquéllos que entran en el animal vía mucosas o se replican en éstas.

18. Una vacuna multivalente según la reivindicación 17, en la que dichos virus o agentes patógenos se seleccionan del grupo formado por rotavirus, el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP), el virus causante del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) y *Serpulina hydiosenteriae*.

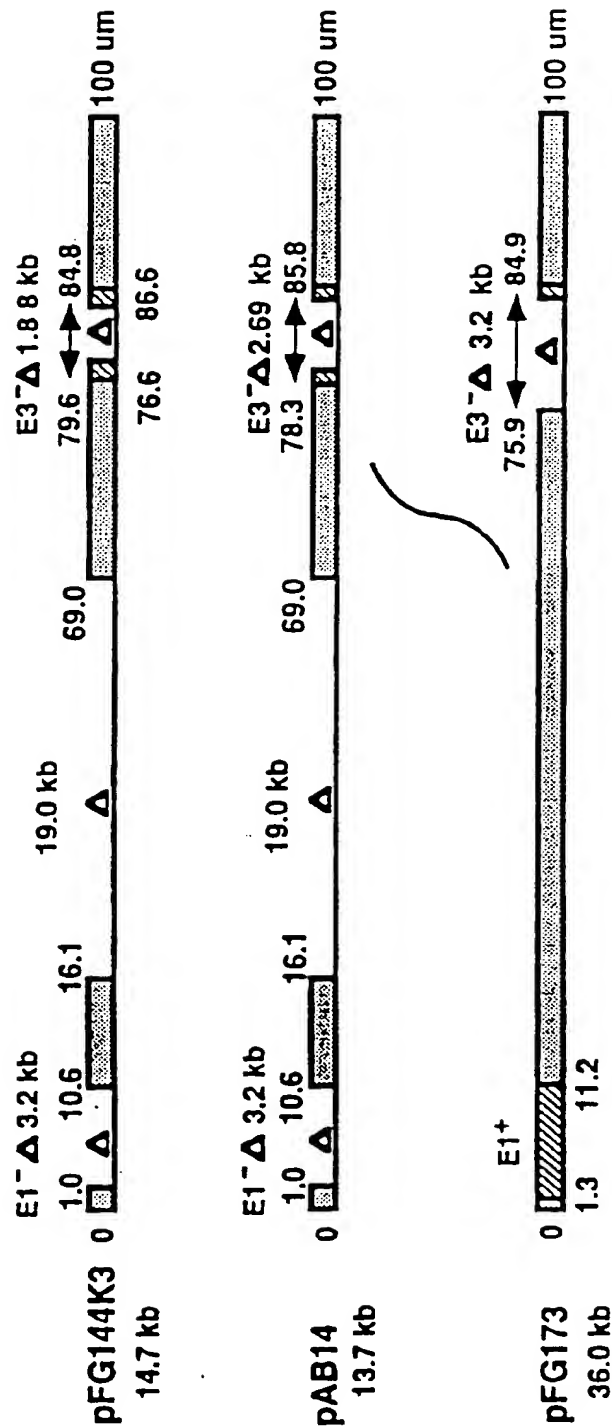


Figura 1

2/7

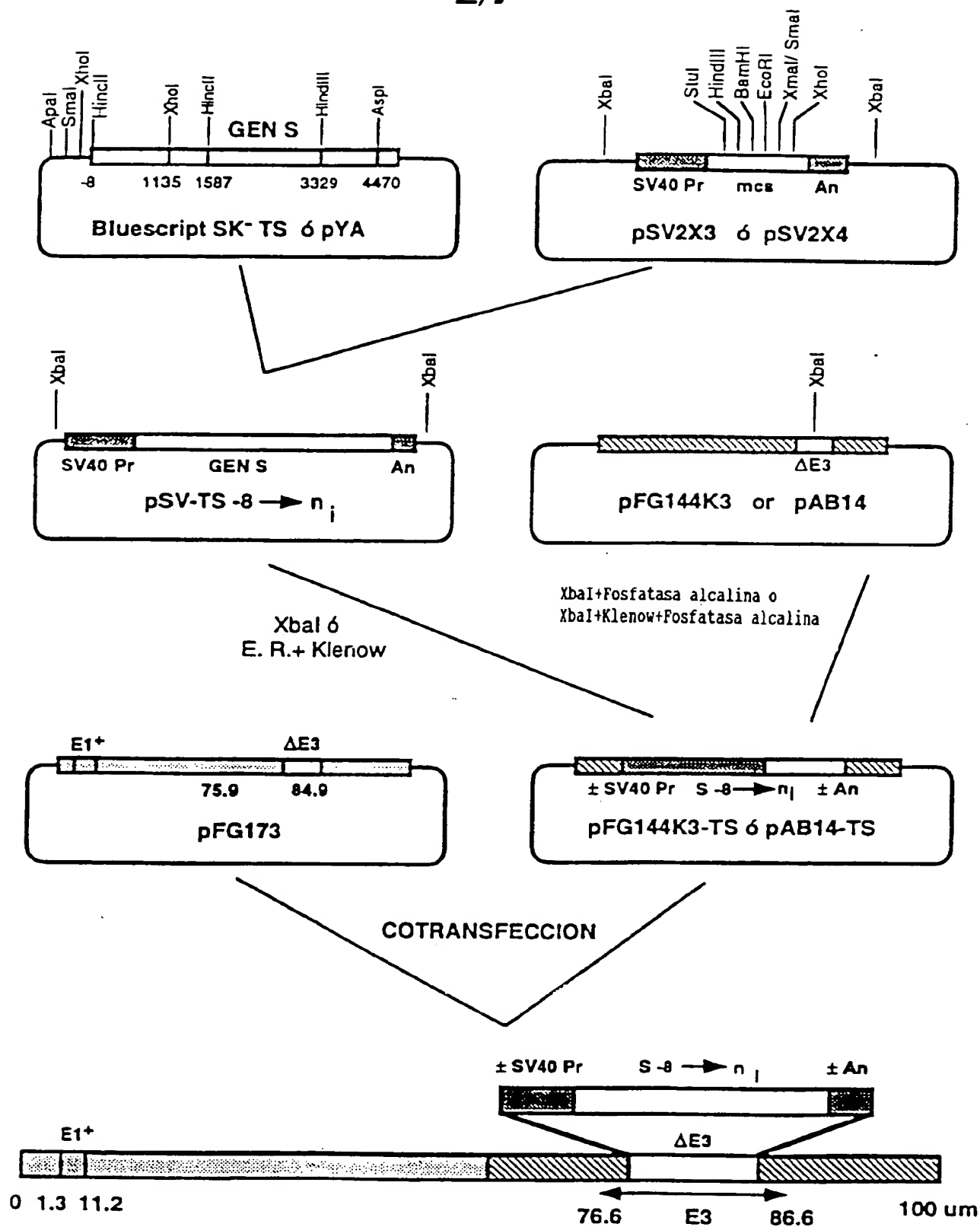


Figura 2

3/7

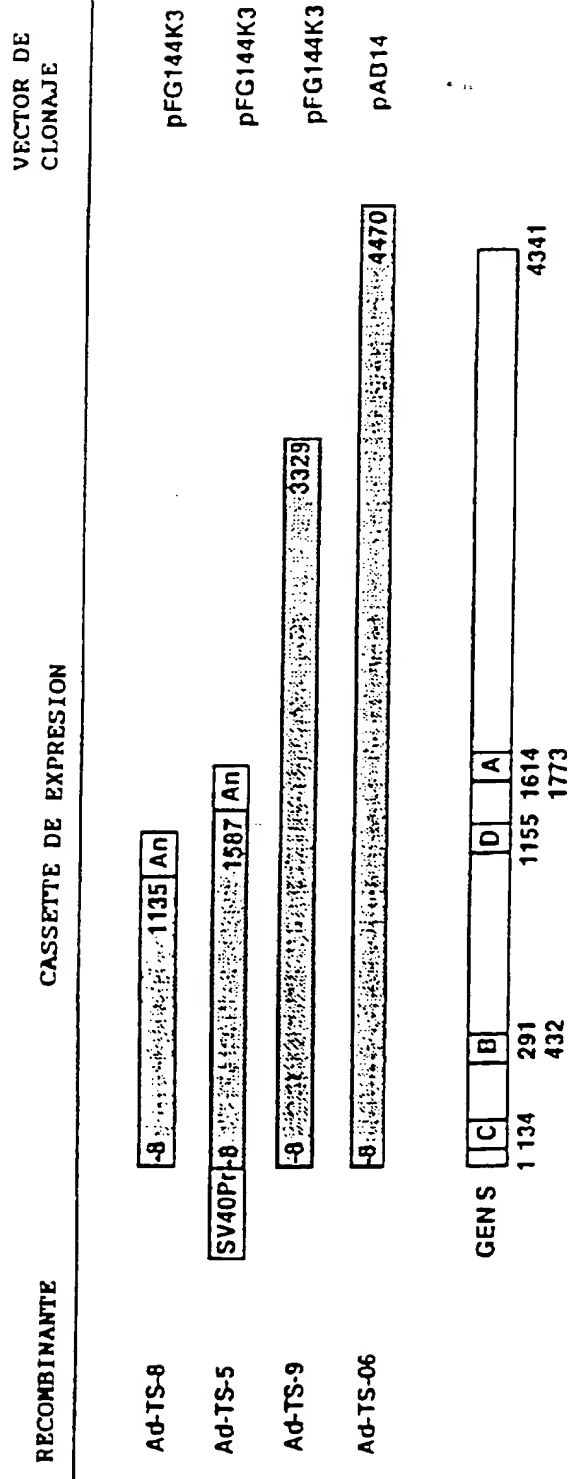


Figura 3

4/7

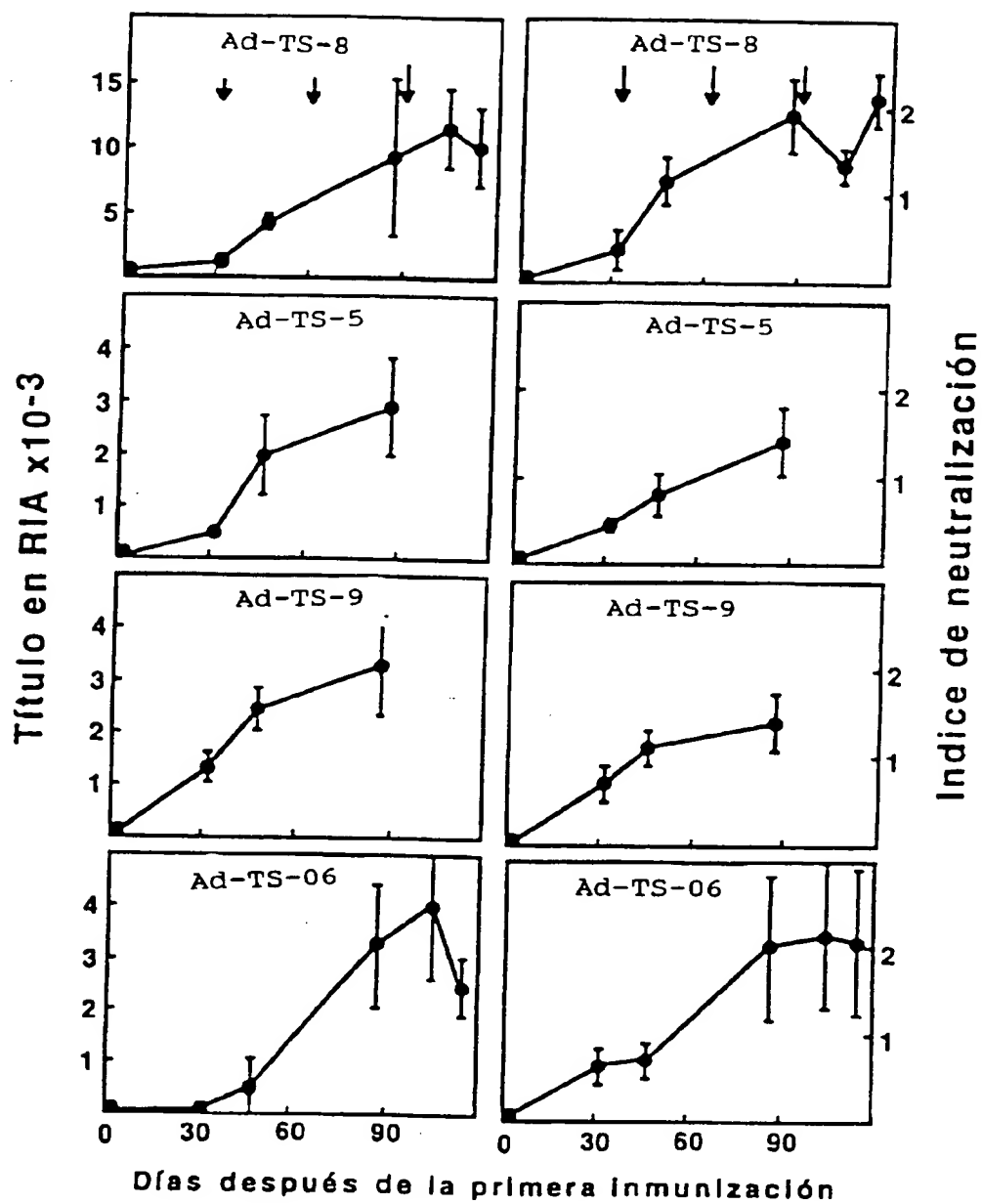


Figura 4

5/7

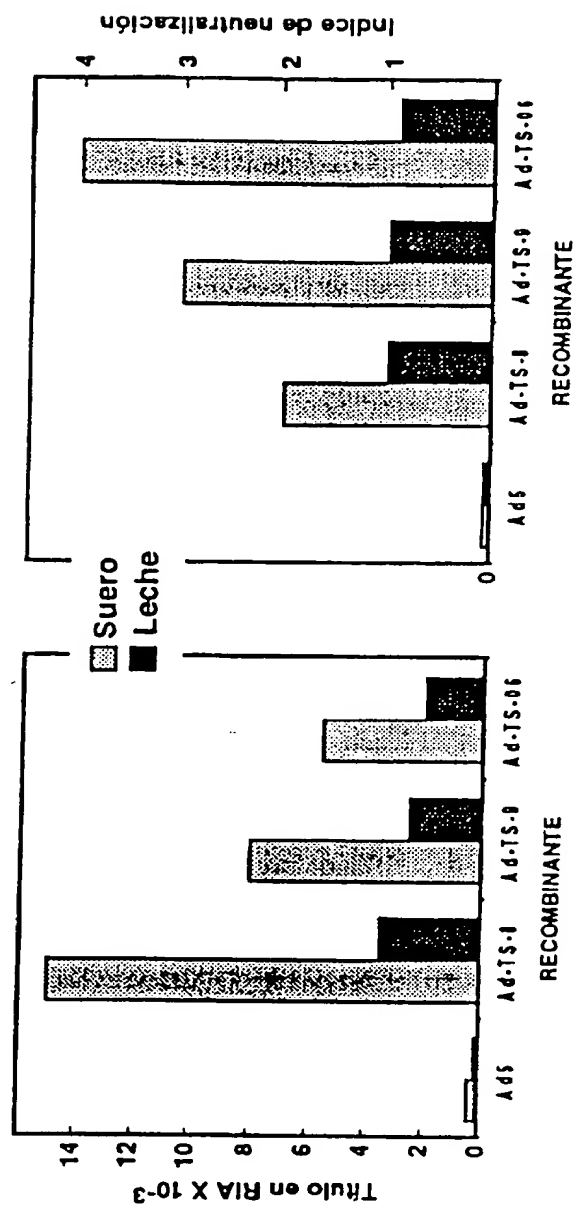


Figura 5

6/7

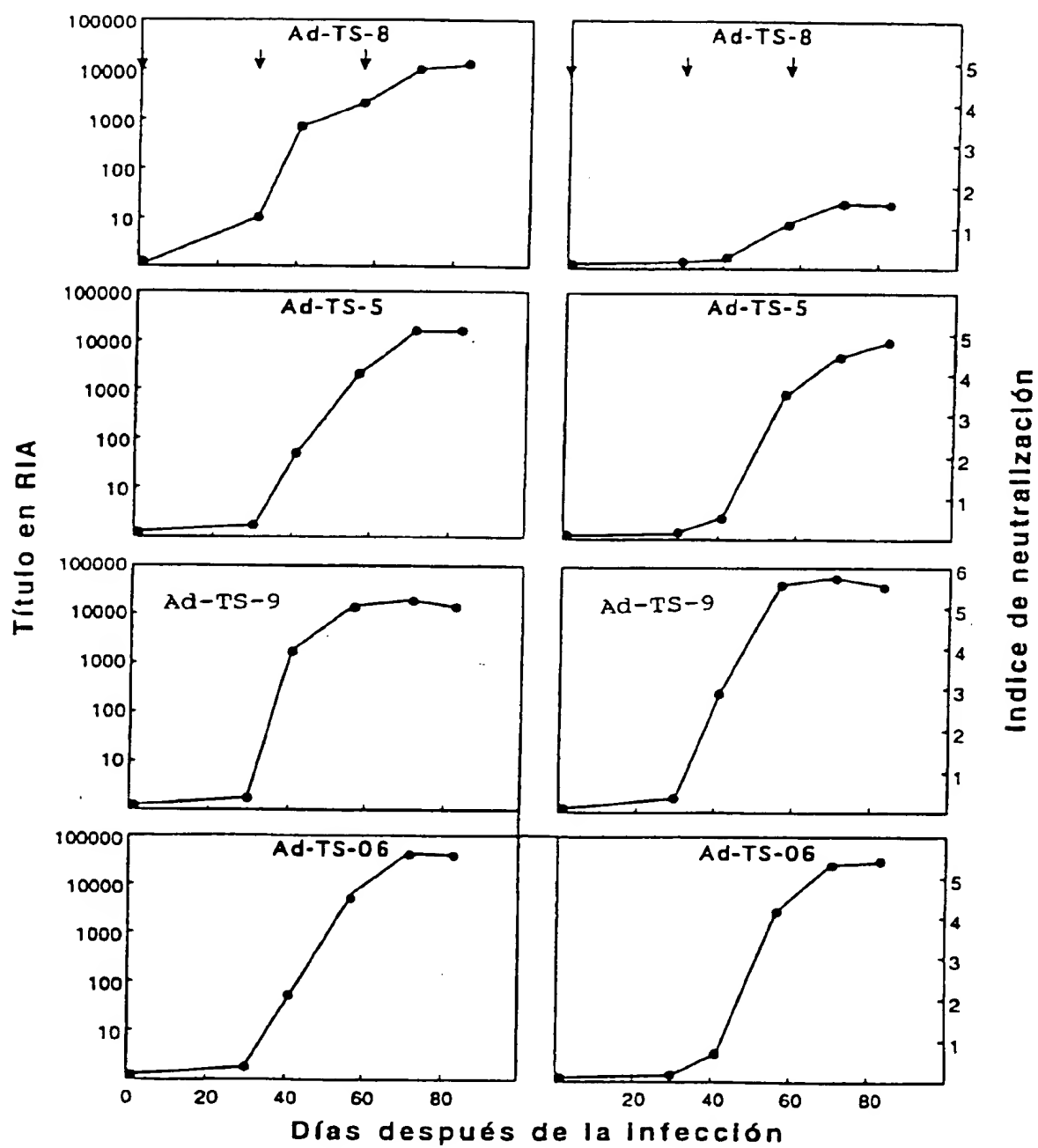


Figura 6

7/7

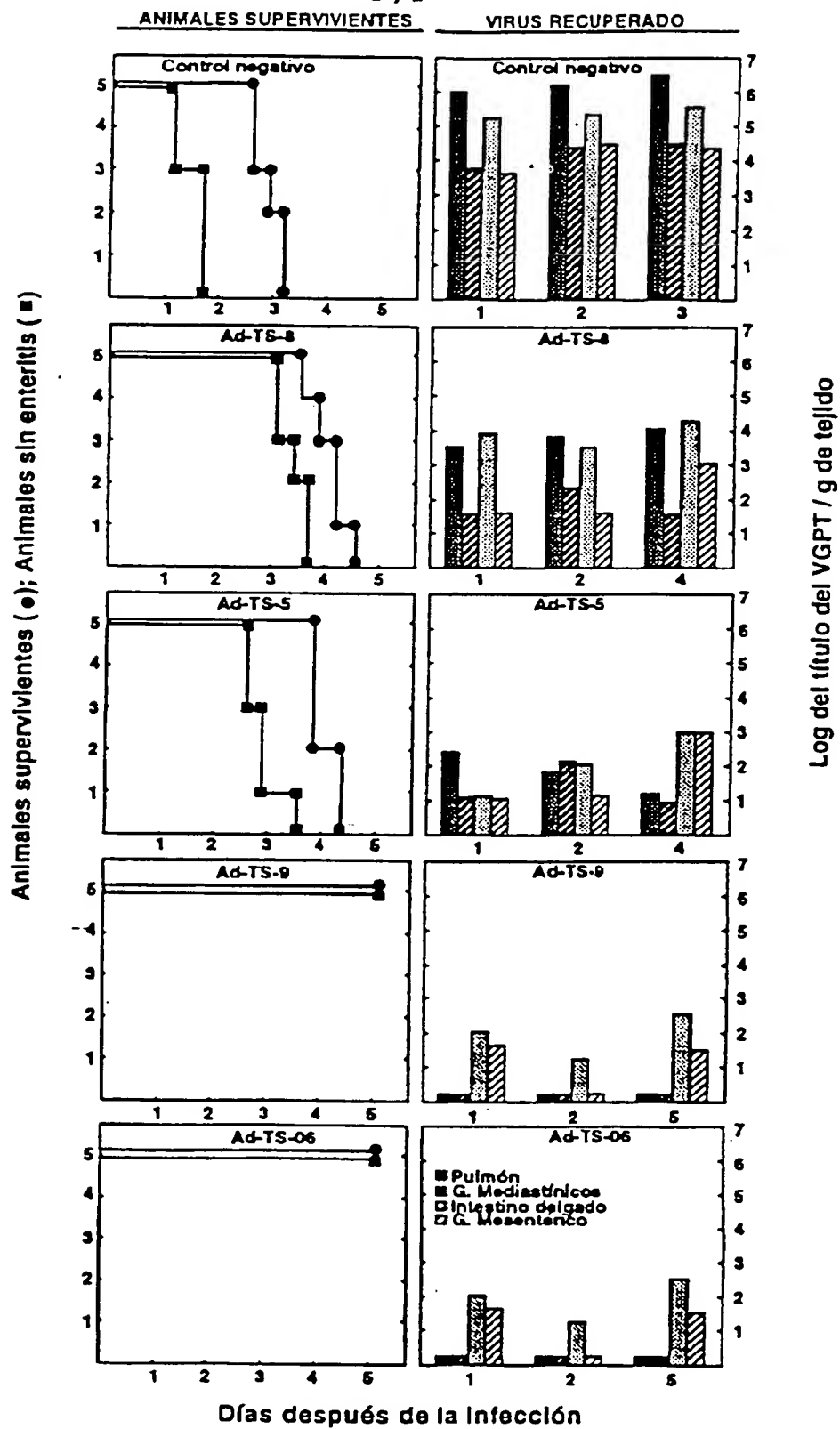



Figura 7

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PCT. 1/96	Solicitud internacional n°	PCT/ES96/00185
--	-----------	----------------------------	----------------

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>25</u> , línea <u>18</u>	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria <input type="checkbox"/>	
Nombre de la institución de depósito EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CULTURES (ECACC)	
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país) PORTON DOWN SALISBURY WILTSHIRE SP4 0JG REINO UNIDO	
Fecha de depósito 29.11.95	n° de orden V95112928
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario)	
Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "n° de orden del depósito")	

Reservado a la oficina receptora	
<input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	
Funcionario autorizado	

Reservado a la Oficina internacional	
<input type="checkbox"/> Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:	
Funcionario autorizado	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/ES 96/00185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N7/01 C12N15/86 A61K39/225 A61K39/235 C07K14/17 A61K39/295		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADV. EXP. MED. BIOL. (1993), 342(CORONAVIRUSES), 455-62 CODEN: AEMBAP; ISSN: 0065-2598, 1993, XP000614783 SMERDOU, CRISTIAN ET AL: "Induction of an immune response to transmissible gastroenteritis coronavirus using vectors with enteric tropism" see page 455, paragraph 1 - paragraph 2; figure 1 see page 457, paragraph 3 - page 458, paragraph 1 see page 460, paragraph 2 - page 461, paragraph 2; figure 5 <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-18
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>* "E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>* "&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">29 January 1997</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">12.02.97</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center;">Montero Lopez, B</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No.
PCI/ES 96/00185

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MEDED. FAC. LANDBOUWWET., UNIV. GENT (1992), 57(48), 2077-84 CODEN: MFLRA3;ISSN: 0368-9697, 1992, XP000614551 CALLEBAUT, P. ET AL: "Development of a recombinant vector virus for vaccination against viral diarrhea and respiratory disease in pigs" see abstract see page 2078, paragraph 2 - paragraph 3 see page 2079, paragraph 5 - paragraph 6 see page 2080, paragraph 3 - page 2083, last paragraph</p>	1-18
X	<p>--- VET. MICROBIOL. (1992), 33(1-4), 249-62 CODEN: VMICDQ;ISSN: 0378-1135, 1992, XP000614637 ENJUANES, LUIS ET AL: "Antigen selection and presentation to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus" see abstract see page 251, paragraph 4 - page 253, paragraph 1 see page 256, last paragraph - page 259, paragraph 4</p>	1-18
X	<p>--- VIROLOGY, vol. 213, no. 2, 10 November 1995, ORLANDO US, pages 503-516, XP002024067 TORRES, JUAN M. ET AL: "Induction of antibodies protecting against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein"</p>	1-14
Y	<p>see abstract see page 503, right-hand column, paragraph 2 - page 504, right-hand column, paragraph 2 see page 507, right-hand column, paragraph 4 - page 514, right-hand column, paragraph 1</p>	15-18
Y	<p>--- WO 91 18627 A (SMITHKLINE-BEECHAM CORPORATION) 12 December 1991 see page 4, line 22 - page 5, line 20 see page 10, line 9 - page 11, line 26 --- -/--</p>	15-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: vna1 Application No

PC1/ES 96/00185

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY , vol. 185, no. 3, 1985, pages 63-82, XP002024068 SYLVIA HU ET AL.: "Studies of TGEV spike protein GP195 expressed in E. coli and by a TGE-vaccinia virus recombinant"	9-14
A	see abstract see page 67, paragraph 2 see page 71, paragraph 2 see page 73, paragraph 1 - page 80, paragraph 4 ---	1-8, 15-18
X	VIROLOGY, vol. 190, no. 1, September 1992, ORLANDO US, pages 92-105, XP002024069 CARLOS M. SÁNCHEZ ET AL.: "Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses" see page 90, left-hand column, paragraph 2 - page 101, left-hand column, paragraph 1 see page 101, right-hand column, paragraph 2 - page 103, right-hand column, paragraph 1 ---	9-14
P,X	J. VIROL. (1996), 70(6), 3770-3780 CODEN: JOVIAM;ISSN: 0022-538X, 1996, XP000616232 TORRES, JUAN M. ET AL: "Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus" see page 3771, left-hand column, paragraph 3 see page 3775, left-hand column, paragraph 2 - page 3777, left-hand column, paragraph 1 see page 3779, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 ---	1-18
P,X	ADV. EXP. MED. BIOL. (1995), VOLUME DATE 1995, 371B, 1535-41 CODEN: AEMBAP;ISSN: 0065-2598, 1995, XP002024070 ENJUANES, LUIS ET AL: "Induction of transmissible gastroenteritis coronavirus specific immune responses using vectors with enteric tropism" see page 1535, paragraph 1 - paragraph 2 see page 1536, paragraph 4 - paragraph 5 see page 1540, paragraph 1; table 4 -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC 1/ES 96/00185

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9118627	12-12-91	AU-A- 1766295	19-10-95
		AU-B- 657907	30-03-95
		AU-A- 7907891	31-12-91
		CA-A- 2082155	30-11-91
		EP-A- 0597852	25-05-94

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solic. internacional N°

PC1/ES 96/00185

A. CLASIFICACIÓN DE LA INVENCIÓN

CIP 6 C12N7/01 C12N15/86 A61K39/225 A61K39/235 C07K14/17
A61K39/295

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 6 C07K A61K C12N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	ADV. EXP. MED. BIOL. (1993), 342(CORONAVIRUSES), 455-62 CODEN: AEMBAP;ISSN: 0065-2598, 1993, XP000614783 SMERDOU, CRISTIAN ET AL: "Induction of an immune response to transmissible gastroenteritis coronavirus using vectors with enteric tropism" ver página 455, párrafo 1 - párrafo 2; figura 1 ver página 457, párrafo 3 - página 458, párrafo 1 ver página 460, párrafo 2 - página 461, párrafo 2; figura 5 --- -/--	1-18

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"I" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

29 Enero 1997

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

12.02.97

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Montero Lopez, B

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Serie Internacional N°
PC1/ES 96/00185

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuó, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	<p>MEDED. FAC. LANDBOUWWET., UNIV. GENT (1992), 57(4B), 2077-84 CODEN: MFLRA3;ISSN: 0368-9697, 1992, XP000614551</p> <p>CALLEBAUT, P. ET AL: "Development of a recombinant vector virus for vaccination against viral diarrhea and respiratory disease in pigs"</p> <p>ver resumen</p> <p>ver página 2078, párrafo 2 - párrafo 3</p> <p>ver página 2079, párrafo 5 - párrafo 6</p> <p>ver página 2080, párrafo 3 - página 2083, ultimo párrafo</p> <p>---</p>	1-18
X	<p>VET. MICROBIOL. (1992), 33(1-4), 249-62 CODEN: VMICDQ;ISSN: 0378-1135, 1992, XP000614637</p> <p>ENJUANES, LUIS ET AL: "Antigen selection and presentation to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus"</p> <p>ver resumen</p> <p>ver página 251, párrafo 4 - página 253, párrafo 1</p> <p>ver página 256, ultimo párrafo - página 259, párrafo 4</p> <p>---</p>	1-18
X	<p>VIROLOGY, vol. 213, num. 2, 10 Noviembre 1995, ORLANDO US, páginas 503-516, XP002024067</p> <p>TORRES, JUAN M. ET AL: "Induction of antibodies protecting against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein"</p>	1-14
Y	<p>ver resumen</p> <p>ver página 503, columna derecha, párrafo 2 - página 504, columna derecha, párrafo 2</p> <p>ver página 507, columna derecha, párrafo 4 - página 514, columna derecha, párrafo 1</p> <p>---</p>	15-18
Y	<p>WO 91 18627 A (SMITHKLINE-BEECHAM CORPORATION) 12 Diciembre 1991</p> <p>ver página 4, línea 22 - página 5, línea 20</p> <p>ver página 10, línea 9 - página 11, línea 26</p> <p>---</p>	15-18
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solic. Internacional N°
PCI/ES 96/00185

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY , vol. 185, num. 3, 1985, páginas 63-82, XP002024068 SYLVIA HU ET AL.: "Studies of TGEV spike protein GP195 expressed in E. coli and by a TGE-vaccinia virus recombinant"	9-14
A	ver resumen ver página 67, párrafo 2 ver página 71, párrafo 2 ver página 73, párrafo 1 - página 80, párrafo 4 ---	1-8, 15-18
X	VIROLOGY, vol. 190, num. 1, Septiembre 1992, ORLANDO US, páginas 92-105, XP002024069 CARLOS M. SANCHEZ ET AL.: "Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses" ver página 90, columna izquierda, párrafo 2 - página 101, columna izquierda, párrafo 1 ver página 101, columna derecha, párrafo 2 - página 103, columna derecha, párrafo 1 ---	9-14
P,X	J. VIROL. (1996), 70(6), 3770-3780 CODEN: JOVIAM;ISSN: 0022-538X, 1996, XP000616232 TORRES, JUAN M. ET AL: "Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus" ver página 3771, columna izquierda, párrafo 3 ver página 3775, columna izquierda, párrafo 2 - página 3777, columna izquierda, párrafo 1 ver página 3779, columna izquierda, párrafo 2 - columna derecha, párrafo 2 ---	1-18
P,X	ADV. EXP. MED. BIOL. (1995), VOLUME DATE 1995, 371B, 1535-41 CODEN: AEMBAP;ISSN: 0065-2598, 1995, XP002024070 ENJUANES, LUIS ET AL: "Induction of transmissible gastroenteritis coronavirus specific immune responses using vectors with enteric tropism" ver página 1535, párrafo 1 - párrafo 2 ver página 1536, párrafo 4 - párrafo 5 ver página 1540, párrafo 1; tabla 4 -----	1-18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de la familia de patentes

Solic. Internacional N°

PCT/ES 96/00185

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO-A-9118627	12-12-91	AU-A-	1766295	19-10-95
		AU-B-	657907	30-03-95
		AU-A-	7907891	31-12-91
		CA-A-	2082155	30-11-91
		EP-A-	0597852	25-05-94
